Fluorometrische Bestimmung von Glucosamin

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Gerd Schwiersch

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. R. AMMON

FLUOROMETRISCHE BESTIMMUNG VON GLUCOSAMIN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1970

vorgelegt von

GERD SCHWIERSCH

geb. am 11. April 1945 in Bad Brückenau

Dekan: Prof. Dr. med. G. DHOM

Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. J. HAAS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 10.11.1970 abgelegt

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	3
2.	Beschreibung der Versuche	
2. 1.	Darstellung von Dansylglucosamin für dünnschichtchromatographische und fluorometrische Vergleiche	7
2. 2.	Darstellung von Dansylglucosamin für die fluorometrische Bestimmung von Glucosamin	8
2. 3.	Dünnschichtchromatographische Trennungen	9
2. 4.	Fluorometrische Messungen	11
3.	Ergebnisse	
3. 1.	Kinetik der Bildung von Dansylglucosamin aus Glucosamin-hydrochlorid und Dansylchlorid in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat	13
3. 2.	Quantitativer Nachweis von Glucosamin	14
4.	Zusammenfassung	17
5.	Literatur	18

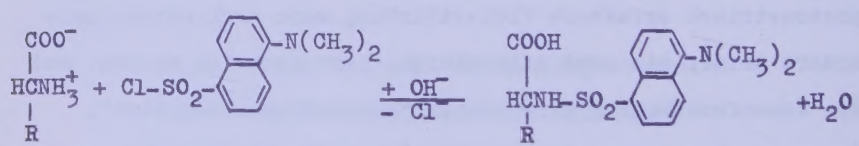
1. EINLEITUNG

Zum Nachweis und zur Bestimmung von D-Glucosamin und anderen 2-Desoxy-2-amino-aldosen wurden zahlreiche Methoden beschrieben (HORTON, 1969). Viele dieser Verfahren sind verhältnismäßig unspezifisch und liefern daher meist recht ungenaue Ergebnisse. Dies gilt vor allem für die Analyse komplexer Gemische, wie sie häufig etwa bei der Untersuchung biologischer Materialien anfallen, es sei denn, daß man derartige Gemische zunächst auftrennt, was aber in der Regel ebenfalls Fehler verursacht. So werden alle Analysenmethoden, die auf der Reduktion von Schwermetallionen bzw. deren Komplexverbindungen beruhen, durch zahlreiche andere reduzierende Substanzen, wie beispielsweise Aldosen oder Ketosen, gestört. Die bei der Reaktion von 2-Desoxy-2-amino-aldosen mit Ninhydrin entstehende, photometrisch erfaßbare Violettfärbung kann auch durch viele andere Amine, wie etwa Aminosäuren, hervorgerufen werden. Bei der besonders häufig verwendeten "Elson-Morgan-Reaktion", d. h. der Umsetzung mit Acetylaceton und p-Dimethylaminobenzaldehyd, erhält man nicht nur mit 2-Desoxy-2-amino-aldosen sondern auch mit verschiedenen anderen Aminozuckern eine photometrierbare Rotfärbung.

Kürzlich fand man (HAAS und WEIGERDING, 1970), daß die Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol zur eindeutigen Bestimmung von Aminozuckern geeignet ist, da die Reaktionsprodukte chromatographisch getrennt und so auch von anderen photometrisch

erfaßbaren N-(2,4-Dinitro-phenyl)-verbindungen, wie etwa denen der Aminosäuren, abgeschieden werden können. Diese sehr empfindliche Methode, die sich auch zum quantitativen Nachweis von Aminozuckern in Hydrolysaten bestimmter Naturstoffe eignet (WEIGERDING, 1970), liefert zwar sehr genaue und zuverlässige Ergebnisse, ist aber verhältnismäßig kompliziert.

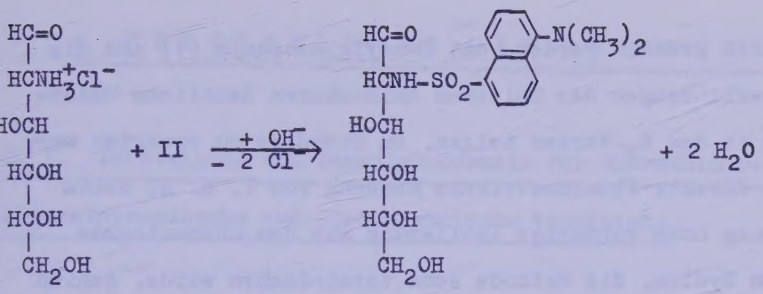
Um Aminozucker besonders genau, schnell und methodisch einfach zu bestimmen, sollte versucht werden, die zum Nachweis von Aminosäuren (I) sowie Peptiden und Proteinen dienende Umsetzung mit 1-Dimethylamino-naphthalin-sulfonylchlorid-(5) ("Dansylchlorid", II) zu den intensiv gelb fluoreszierenden N- [1-Dimethylamino-naphthalin-sulfonyl-(5)] -aminosäuren ("Dansylaminosäuren", III) (WEBER, 1952, SEILER, 1970) auf Aminozucker zu übertragen. Dies sollte am Beispiel der Be-



I II III

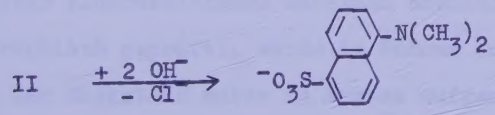
R = Aminosäure-"rest"

stimmung von 2-Desoxy-2-amino-D-glucose-hydrochlorid ("Glucosamin-hydrochlorid", IV) studiert werden. (Die Zucker werden, wegen besserer Übersichtlichkeit, in der ringoffenen Form und in der Schreibweise nach E. FISCHER angegeben).



IV V

Dabei war von vorneherein klar, daß es sich um keine einfache Übertragung handeln konnte. Sowohl IV als auch das bei der Reaktion mit II zu erwartende und erwünschte Reaktionsprodukt (N-[1-Dimethylamino-naphthalin-sulfonyl-(5)]-D-glucosamin, "Dansylglucosamin", V) sind nämlich im Gegensatz zu Aminosäuren (I) und deren Dansylderivaten (III) alkaliempfindlich. Es war daher zu erwarten, daß IV und V durch die für die Reaktion erforderliche Base angegriffen werden, besonders, wenn diese in Überschuß eingesetzt wird. Da außerdem II in alkalischer Lösung zu der intensiv blau fluoreszierenden 1-Dimenthylamino-naphthalin-sulfonsäure-(5) bzw. ihrem Anion (VI) hydrolysiert wird, war weiterhin vorherzusehen, daß vor der



VI

quantitativen Erfassung von V die verschiedenen in Gegenwart von Base zu erwartenden Umsetzungsprodukte chromatographisch getrennt werden müssen. Das chromatographische System sollte

hierbei so gewählt werden, daß Dansylglucosamin (V) und die Dansylverbindungen der üblichen Aminosäuren deutliche Unterschiede in den R_F-Werten zeigen. Da überdies zu erwarten war, daß die direkte fluorometrische Messung von V, d. h. seine Bestimmung ohne vorherige Isolierung aus dem chromatographischen System, die Methode sehr vereinfachen würde, schien es sinnvoll, sich bei der Suche nach geeigneten chromatographischen Verfahren besonders auf die Dünnschichtchromatographie zu konzentrieren.

2. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

2. 1. Darstellung von Dansylglucosamin für dünnschicht- chromatographische und fluorometrische Vergleiche

Eine Lösung von 0,5 g Dansylchlorid (II, Firma FLUKA AG, Buchs, Schweiz) in 200 ml Aceton wurde mit 4 g D-Glucosamin-hydrochlorid (IV), gelöst in 200 ml Wasser, und 8 ml einer 1 M wässrigen Lösung von Natriumhydrogencarbonat vermischt. Es wurde 90 min bei 20° gerührt und dann bei etwa 40° im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit Aceton extrahiert, bis er nicht mehr gelb fluoreszierte (Anregung bei 366 nm). Der Extrakt, im Vakuum auf wenige ml eingeengt, wurde auf eine Säule gegeben (20 x 5 cm, Kieselgel 0,05 - 0,2 mm, 70 - 325 mesh ASTM, für die Säulenchromatographie, Firma E. MERCK AG, Darmstadt), die mit Chloroform-Methanol (9:1, v:v) vorbehandelt worden war. Beim Waschen mit dem gleichen Gemisch wurden zunächst 2 schwach gelb fluoreszierende Banden eluiert. Das weitere Eluat, das eine einzige intensiv gelb fluoreszierende Substanz enthielt (dünnschichtchromatographisch geprüft), wurde im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und das Filtrat eingedampft. Nach mehrmaliger Wiederholung wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 196°- 199° $[\alpha]_D^{20}$ = - 12° (c=1, Methanol, nach 7 min). Die gelbe Fluoreszenz ist optimal bei 390 nm anregbar.

$C_{18}H_{27}N_2O_7S$; berechnet: C: 52,45%; H: 5,82%; N: 6,8%
gefunden : C: 52,18%; H: 6,12%; N: 6,8%

V kann aus solchen Ansätzen auch durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel G (nach STAHL, Firma E. MERCK AG, Darmstadt) mit Chloroform-Dioxan-Methanol (35:35:9, v:v:v) abgetrennt werden.

2. 2. Darstellung von Dansylglucosamin für die fluorometrische Bestimmung von Glucosamin

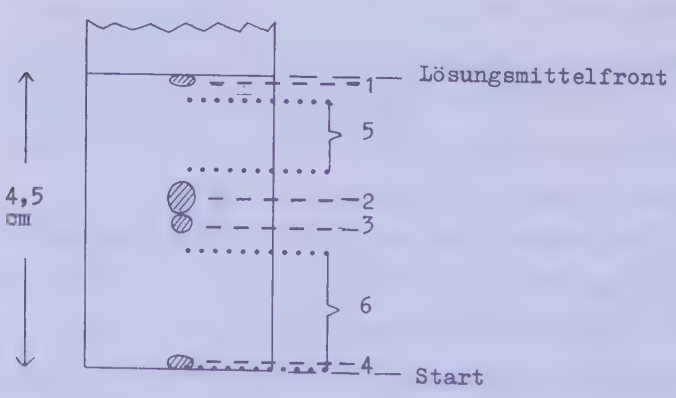
Auch zum quantitativen Nachweis wurde Glucosamin analog der "Dansylierung" von Aminosäuren (BOULTON und BUSH, 1964) mit Dansylchlorid in Wasser-Aceton und in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat umgesetzt, wobei, entgegen den Erwartungen (HAAS und WEIGERDING, 1970), Zusätze von N,N-Dimethylformamid ohne Einfluß waren. Da hierbei, unabhängig von den relativen Konzentrationen der Reaktionspartner, stets auch VI entstand, wurde immer mit einem verhältnismäßig großen Überschuß an Dansylchlorid gearbeitet.

2. 3. Dünnschichtchromatographische Trennungen

Zur dünnschichtchromatographischen Abtrennung von Dansyl=glucosamin sind sowohl selbstgestrichene Kieselgel-Platten (STAHL, 1967) wie auch Kieselgel-Fertigplatten geeignet. Fertigplatten sind aufgrund der kompakteren und weitgehend homogenen Beschichtung bei der fluorometrischen Auswertung leichter zu handhaben und liefern besser reproduzierbare Ergebnisse. Allerdings ergibt Dansylglucosamin auf allen untersuchten Fertigplatten einen Haupt- und einen wenig langsameren Nebenfleck, während es auf selbstgestrichenen Platten nur einen einzigen Flecken liefert. Wahrscheinlich wird dies durch unterschiedliche Absorption des Dansyl=glucosamins an Kieselgel und an den in den Fertigplatten vorhandenen Bindemitteln verursacht. Dafür spricht, daß der Haupt- und der Nebenfleck bei erneuter Chromatographie wieder je 2 Flecken ergeben. Von den untersuchten Fertig=platten bewährten sich am besten DC-Karten Si F (Firma RIEDEL DE HAEN AG, Seelze), als Laufmittel ergaben Benzol-Methanol-Dioxan (28:4:56, v:v:v) oder Isoamylalkohol-Chloro=form-Dioxan (24:15:10, v:v:v) bei Laufstrecken von etwa 4,5 cm besonders gute Resultate. In diesen Systemen wandert nicht umgesetztes Dansylchlorid mit der Front, 1-Dimethyl=amino-naphthalin-sulfonsäure-(5) bzw. ihr Natriumsalz (VI, Seite 5) bleiben nahe am Start, während Dansylglucosamin, wie sich durch Vergleich mit authentischem Material (vgl. Abschnitt 2. 1. Seite 7) ergab, einen R_F-Wert von 0,6 zeigt.

Die in den Analysenansätzen stets enthaltenen Spuren weiterer Substanzen haben R_F-Werte zwischen 0,6 und 1,0. Die R_F-Werte der Dansylderivate von 18 der wichtigsten Aminosäuren (Satz DANSYL-AS I, Firma SERVA-ENTWICKLUNGSLABOR, Heidelberg) liegen zwischen 0,0 und 0,4. Das Schema einer derartigen Trennung ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Die außergewöhnlich

Abbildung 1: Schema der Auftrennung von Ansätzen zur Bestimmung von Glucosamin-hydrochlorid mit Dansylchlorid in Gegenwart von Dansylaminosäuren durch Dünnschichtchromatographie an DC-Karten Si F in Benzol-Methanol-Dioxan (24:15:10, v:v:v).



1: Dansylchlorid (II); 2: Dansylglucosamin (V, Hauptfleck); 3: Dansylglucosamin (V, Nebenfleck); 4: 1-Dimethylamino-naphthalin-sulfonsäure-(5) bzw. ihr Natriumsalz (VI); 5: Bereich mit weiteren Produkten der Reaktion von Glucosamin-hydrochlorid mit II; 6: Bereich mit Dansylaminosäuren (III). Die Flecken fluoreszieren blau bzw. gelb nach Anregung bei 366 nm bzw. bei 390 nm.

kleine Laufstrecke (etwa 4,5 cm) bedingt, daß die Flecken 2 und 3 (Abbildung 1) nur eine solche Größe erreichen, daß sie, entsprechend der Spalthöhe des verwendeten Fluorometers, gemeinsam quantitativ erfaßt werden können.

Der in den DC-Karten vorhandene, bei 254 nm anregbare Fluoreszenzindikator stört die fluorometrische Bestimmung des bei 390 nm optimal anregbaren Dansylglucosamins nicht. Der Fluoreszenzindikator ist selbstverständlich völlig überflüssig. Jedoch waren indikatorfreie DC-Karten nicht erhältlich.

2. 4. Fluorometrische Messungen

Verwendet wurde ein Fluorometer (Modell 111, Firma G.K. TURNER ASSOCIATES; Palo Alto, USA) mit DC-Messtür (Modell 111-898, CAMAG AG, Muttenz, Schweiz) und Servogor-Schreiber mit Integrationseinrichtung (Typ RE 512, GOERZ-ELEKTRO GmbH, Wien, Österreich). Als Lichtquelle diente eine UV-Fluoreszenzlampe (Typ 110-850, Firma G.K. TURNER ASSOCIATES, Palo Alto). Als Primärfilter wurde verwendet Typ 110-812 (Firma G.K. TURNER ASSOCIATES, Palo Alto), als Sekundärfilter Typ 110-822 (Firma G.K. TURNER ASSOCIATES, Palo Alto) und, falls eine Abschwächung der Fluoreszenzstrahlung erforderlich war, zusätzlich Typ 110-823 (10%) (Firma G.K. TURNER ASSOCIATES, Palo Alto) oder Typ 110-817 (Firma G.K. TURNER ASSOCIATES, Palo Alto), wobei am Fluorometer der Empfindlichkeitsbereich 10 gewählt wurde. Im allgemeinen wurde mit einer Spaltbreite

von 2,1 mm bei einem Plattenvorschub von 2,4 cm/min (Einstellung 2) gearbeitet. Als günstig erwies sich eine Schreiberempfindlichkeit von 10 mV und ein Papiervorschub von 40 cm/min.

3. ERGEBNISSE

3. 1. Kinetik der Bildung von Dansylglucosamin aus Glucosamin-hydrochlorid und Dansylchlorid in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat

Um Glucosamin in Form seines Dansylderivates bestimmen zu können, sollte zunächst ermittelt werden, auf welche Weise der Aminozucker mit 100 proz. Ausbeute mit Dansylchlorid umzusetzen ist. Es erwies sich aber als unnötig, die Reaktionsbedingungen für eine derartige Umsetzung aufzusuchen. Es zeigte sich nämlich (Tabelle 1), daß in $1{,}8 \times 10^{-3}$ bis $14{,}3 \times 10^{-3}$ M Lösungen von Glucosamin-hydrochlorid die Bildungsgeschwindigkeit von Dansylglucosamin innerhalb der ersten 7 min (bei geeigneten Konzentrationen auch noch später) proportional der Ausgangskonzentration an Glucosamin ist, wenn man Dansylchlorid in mindestens 8 fachem und höchstens 32 fachem und Natriumhydrogencarbonat in mindestens 6,6 fachem Überschuß einsetzt. Diese Kinetik ermöglicht eine außerordentlich schnelle und genaue Bestimmung von Glucosamin, obwohl innerhalb der genannten Zeit Dansylglucosamin mit einer Ausbeute von nur etwa 50% der Theorie entsteht. Diese Art der "kinetischen Bestimmung" von Glucosamin hat überdies den wesentlichen Vorteil, daß dabei selbstverständlich die Alkaliempfindlichkeit von Glucosamin und Dansylglucosamin, die eine 100 proz. Umwandlung von Glucosamin in Dansylglucosamin beeinträchtigen oder sogar verhindern würde, ohne Belang ist.

Tabelle 1: Umsetzung von Glucosamin-hydrochlorid mit Dansylchlorid und Natriumhydrogencarbonat bei 20°.

$[\text{Glucosamin-hydrochlorid}]_o$	$[\text{Dansylchlorid}]_o$	$[\text{Dansylglucosamin}]_t$			
		t=5min		t=7min	
(10^{-7}Mol)	(10^{-7}Mol)	(10^{-7}Mol)	K	(10^{-7}Mol)	K
2	640	2	5		
10	640	5,1	9,8		
10	320			4,4	15,9
20	640	6,04	16,5	9,1	15,4
40	640	12,8	15,7	19,2	14,6
80	640			34,8	16,1
160	640			62,4	17,9

Glucosamin-hydrochlorid wurde in 0,1 ml Wasser, Dansylchlorid in 0,4 ml Aceton gelöst. Das Gemisch wurde mit 0,06 ml 1 M wässrigem Natriumhydrogencarbonat versetzt. Nach 5 und nach 7 min wurde 1 µl entnommen und chromatographiert. $[\text{Glucosamin-hydrochlorid}]_o$, $[\text{Dansylchlorid}]_o$, $[\text{Dansylglucosamin}]_t$: Zahl der Mole im Gesamtgemisch (0,56 ml) nach 0 bzw. t min. $[\text{Dansylglucosamin}]_t$ wurde fluorometrisch durch Vergleich mit definierten Mengen authentischen Dansylglucosamins (Abschnitt 2. 1., Seite 7) bestimmt.

$$K = \frac{[\text{Glucosamin-hydrochlorid}]_o}{[\text{Dansylglucosamin}]_t} \times t$$

$\bar{K} = 15,7 \pm 0,6$; zur Mittelwertsbildung wurden die K-Werte der 3. bis 6. Zeile verwendet.

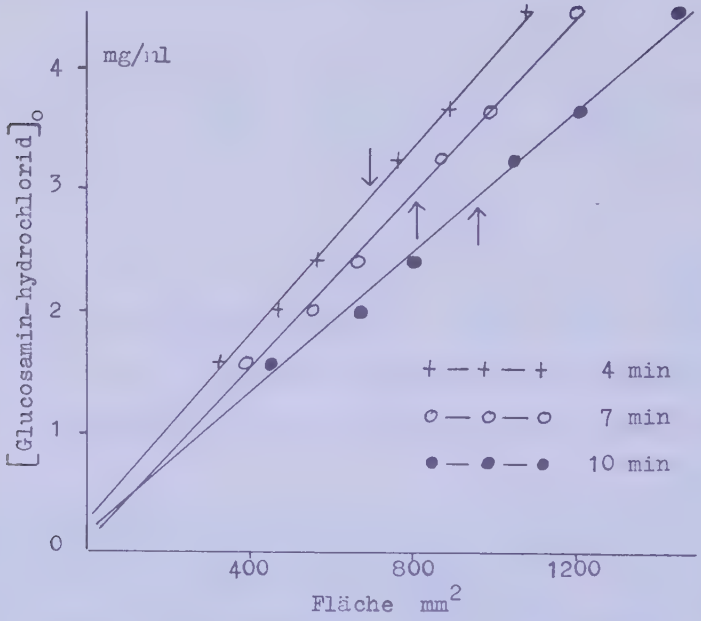
3. 2. Quantitativer Nachweis von Glucosamin

Zur Bestimmung von Glucosamin in Lösungen unbekannter Konzentrationen erübrigt sich selbstverständlich die Bestimmung der

Konstanten $\overline{K}$ (Tabelle 1) und daher auch die präparative Darstellung von Dansylglucosamin. Der quantitative Nachweis kam vielmehr durch Vergleich der Geschwindigkeiten der Dansylglucosaminbildung in der zu analysierenden Lösung und in einer Verdünnungsreihe mit bekannten Glucosaminkonzentrationen erfolgen (Abbildung 2). Das in Abbildung 2 dargestellte Beispiel zeigt, daß Glucosamin in diesem Falle mit einem Fehler von +3,9% bestimmt wurde. Der gefundene Wert ist als zuverlässig zu betrachten, da er im Konzentrationsbereich der Vergleichslösungen bekannter Glucosamingehalte liegt, und der Fehler nicht wesentlich größer als der der Steigungen der Geraden ist.

Eine im Vergleich zu dem angegebenen Beispiel geringere Menge an Glucosamin bzw. Glucosamingehalte in noch verdünnteren Lösungen sind auf gleiche Weise bestimmbar, sofern man die Konzentrationen an Dansylchlorid und an Natriumhydrogencarbonat entsprechend herabsetzt, wobei aber das angegebene Verhältnis von Aceton und Wasser in den Reaktionsgemischen beizubehalten ist. Durch Vergrößerung der Fluorometerempfindlichkeit kann die Nachweisgrenze weiter heruntergesetzt werden. Mit dem angegebenen Gerät kann man im Extremfall die Glucosaminkonzentration in 0,05 ml einer 10^{-3} M Lösung, d. h. 5×10^{-8} Mol Glucosamin quantitativ nachweisen; die Einzelflecke müssen mindestens 5×10^{-11} Mol Dansylglucosamin enthalten. Durch Verfeinerung der chromatographischen Arbeitstechnik (ZURCHER, PATAKI, BORKO und FREI, 1969) könnte die Nachweisgrenze sicher weiter herabgesetzt werden.

Abbildung 2: Gehaltsbestimmung einer Lösung von 2,80 mg Glucosamin-hydrochlorid in 1 ml Wasser.



Gleiche Volumina (0,08 ml) der zu untersuchenden Lösung und der Lösungen bekannter Konzentration an Glucosamin (1,6; 2,0; 2,4; 3,2; 3,6; 4,4 mg Glucosamin-hydrochlorid in 1 ml Wasser) wurden bei 20° mit je 0,3 ml einer Lösung von 160 mg Dansylchlorid in 10 ml Aceton und 0,07 ml einer Lösung von 142,8 mg Natriumhydrogencarbonat in 10 ml Wasser versetzt. Nach 4, 7 und 10 min wurde je 1 µl dünnschichtchromatographiert, die dem Dansylglucosamin entsprechenden Flecke fluorometriert, und die Konzentrationen der Eichlösungen gegen die gemessenen Flächen aufgetragen. Die Funktionen der den Entnahmezeiten entsprechenden Geraden wurden mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt und die Fehler der Steigungen durch paarweisen Vergleich bestimmt. Die Glucosaminkonzentration der Untersuchungslösung ergab sich durch Abgreifen (⟶) der entsprechenden Flächenwerte an diesen Geraden bzw. durch Berechnung aus deren Funktionen zu 2,88, 2,99 bzw. 2,86 mg/ml (Mittelwert: 2,91 mg/ml).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Geschwindigkeit der Bildung von Dansylglucosamin bei der Reaktion von Glucosamin-hydrochlorid mit großen Überschüssen an Dansylchlorid und Natriumhydrogencarbonat ist innerhalb der ersten Minuten proportional der Ausgangskonzentration an Glucosamin. Aufgrund dieser Kinetik ist es durch Vergleich mit den Bildungsgeschwindigkeiten von Dansylglucosamin in Lösungen bekannter Glucosaminkonzentration möglich, die Glucosaminmengen in Lösungen unbekannter Konzentrationen quantitativ nachzuweisen. Die Alkaliempfindlichkeiten von Glucosamin und Dansylglucosamin stören die Bestimmung nicht. Authentisches Dansylglucosamin ist für die Bestimmung nicht erforderlich. Die Bestimmung des Dansylglucosamins erfolgt nach dünnschichtchromatographischer Abtrennung durch Messung seiner bei 390 nm optimal anregbaren, intensiv gelben Fluoreszenz, ohne daß die Substanz von den Dünnschichtplatten isoliert werden muß.

Beispielsweise können so 0,224 mg Glucosamin-hydrochlorid in 0,08 ml Wasser mit einem Fehler von +3,9% quantitativ erfaßt werden.

Die Flecke, die fluorometriert werden sollen, müssen mindestens 5×10^{-11} Mol Dansylglucosamin enthalten, wenn man die Dünnschichtchromatographie in der üblichen Art durchführt und mittlere Empfindlichkeiten des Fluorometers verwendet.

5. L I T E R A T U R

BOULTON, A. A. und BUSH, I. E.: Qualitative and Quantitative Analysis of Amino Acids as their "Dansyl" Derivatives
Biochem. J. 92, (1964): 11P-12P

HAAS, H. J. und WEIGERDING, A.: Methode zum quantitativen Nachweis von Hexosaminen als N-2,4-Dinitrophenyl-Derivate
Carbohyd. Res. 12, (1970): 211-218

HORTON, D.: Detection and Determination of 2-Amino-2-deoxy Sugars
in: JEANLOZ, R. W.: The Amino Sugars, Bd. IA, New York und London, 1969: 4-18

SEILER, N.: Use of the Dansyl Reaktion in Biochemical Analysis
Methods of Biochemical Analysis 18, (1970): 259-337

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie,
2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York 1967

WEBER, G.: Fluorescent Conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin
Biochem. J. 51, (1952): 155-167

WEIGERDING, A.: Quantitativer Nachweis von Hexosaminen als N-2,4-Dinitrophenyl-Derivate
Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg 1970

ZURCHER, H., PATAKI, G., BORKO, J. und FREI, R. W.: Quantitative Thin-layer Chromatography - IX: Investigation on the reproducibility of direct spectrophotometry and fluorometry
J. Chromatog. 43, (1969): 457-462

D A N K

Ich danke Herrn Prof. Dr. Haas für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Bearbeitung der verschiedenen Sachfragen. Im besonderen danke ich Herrn Prof. Dr. Haas dafür, daß er in hervorragender Weise dazu beigetragen hat, stets eine außerordentlich günstige Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 11. April 1945 in Bad Brückenau als zweiter Sohn des Eisenbahnsekretärs Eduard Schwiersch und seiner Ehefrau Helene Schwiersch geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Saarbrücken - St. Arnual. Mein weiterer Schulweg führte danach zwei Jahre lang zur städt. Knabenmittelschule, von der ich 1957 auf das städt. Knabenrealgymnasium in Saarbrücken überwechselte und im Jahre 1964 dort die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich mit dem Medizinstudium an der hiesigen Universität, an der ich 1965 die naturwissenschaftliche, 1967 die ärztliche Vorprüfung und im Juni 1970 die ärztliche Prüfung bestand.